

Zero pFAST-T Simple Cloning Kit

零背景 pFAST-T Simple 克隆试剂盒

货号: DT122-01

规格: 20 次

保存: -20 °C

【产品简介】

本产品利用Topoisomerase 原理可以在瞬间完成连接的优良特性, 结合特有的工艺制成。与传统T4连接酶原理不同, 可以不用冰浴和热休克, 室温5min 内完成连接, 37°C 复苏10min即可涂板, 全过程只需15-20min; 无自连、零背景, 无需蓝白斑筛选, 长至10kb 的片段亦可高效连接, 阳性克隆率近100%。

本产品克隆插入位点两侧不含多克隆酶切位点, 需要在PCR扩增引物上导入合适的酶切位点。此时如果对使用PCR扩增引物导入的酶切位点进行DNA酶切时, 酶切反应将不会受到载体上其它多克隆酶切位点上的限制酶影响, 可以大大提高酶切效率, 增加亚克隆成功率。

提示: 测序只能采用 M13F/M13R通用引物测序 (见后面图谱), 但是不能采用M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。菌落PCR可使用和测序相同的引物。

【产品组分】

试剂盒组成	20 次(DT122-01)	100 次(DT122-05)
pFAST-T Simple Vector (30 ng/μl)	20 μl	100 μl
1 Kb Control (30 ng/μl)	5 μl	5 μl
10 × Enhancer	20 μl	100 μl

【保存条件】

-20 °C 恒温保存, 有效期一年。

【操作步骤】

1. 连接反应的准备:

- PCR引物不能磷酸化。
- 使用Taq系列的DNA聚合酶扩增。
- 仅有目的条带、无非特异条带和引物二聚体的PCR产物可直接进行连接反应, 无需纯化, 否则建议胶回收纯化。如果以质粒为模板的PCR产物则建议进行纯化。

2. 连接反应:

(1) 室温 (25 °C-35 °C) 按照如下体系操作 (10 μl 体系):

纯化后的 PCR 产物/或者 1 μl 1 Kb control	0.5-5 μl
pFAST-T Simple Vector	1 μl
10 × Enhancer	1 μl
ddH ₂ O	Up to 10 μl

所有组分加完后, 用移液器轻轻吹打混匀或者轻弹管底混匀, 低速瞬时离心后室温 (25°C-35°C) 连接反应 5 min。长片段或者连接困难片段可以延长连接时间到 10-15 分钟, 温度可选 37°C, 可显著增加转化子数量。

注: 此步骤在室温进行, 不可置于冰上, 否则会降低连接效率。

不同大小插入片段的推荐用量:

插入片段大小 (bp)	最佳用量 (ng)
100-1000	10-40
1000-2000	40-80
2000-5000	80-150

(2) 连接产物可直接转化感受态细胞或贮存于-20 ℃。

如尚未准备好感受态细胞，可以将连接产物短时间置于冰上备用。

3. 转化:

(1) 50-100 μl 感受态细胞，置于室温解冻，完全解冻后（约 1min 左右）轻弹几次将细胞均匀悬浮。

(2) 加入 5 μl 连接液(最多可全部加入，但体积不要超过感受态细胞体积的 1/10)，轻轻混匀，冰上放置 5min。42℃水浴热休克 60 秒，冰上放置 2-3 分钟。

(3) 加 300-500 μl 平衡至室温的 LB 或者 SOC 培养基(不含抗生素)，37℃ 180 rpm 振荡培养 10min。若感受态细胞转化效率低或者插入片段大于 2 Kb，可以增加复苏时间至 30-60min 以得到更多的转化子。

(4) 取 100-200 μl 菌液涂板(含氨苄青霉素 100 μg/ml)，过夜培养。

4. 转化子的筛选鉴定:

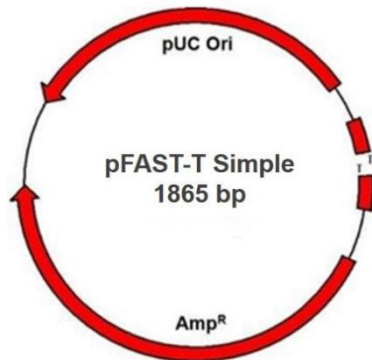
本产品阳性率极高，一般所见即所得，在无杂菌污染及转化子数量不算太少的情况下，所长菌落基本为包含插入片段的阳性克隆。因此插入片段不超过 2-3 Kb 时，无需鉴定，直接挑菌测序。

(1) 用上述培养的白色菌落的菌液抽提质粒，插入片段较大的情况下，直接跑电泳看质粒大小就能鉴定出有插入的质粒。

(2) PCR 法鉴定：挑取菌落直接进行 PCR 检测。

(3) 测序法：使用通用 M13F/M13R 引物测序来确定是否含有目的克隆。**注意测序引物不能采用 M13(-47)/M13(-48)通用引物测序。**

❖ pFAST-T Simple 载体图谱:

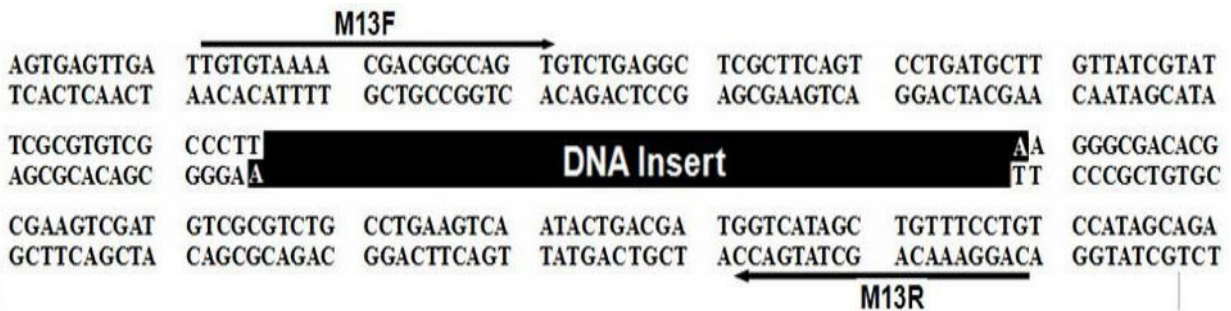


pFAST-T Simple 载体测序引物序列：
 M13F: TGTA AACGACGGCCAGT
 M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

❖ pFAST-T Simple 载体通用测序引物序列:

M13F: TGTA AACGACGGCCAGT
 M13R: CAGGAAACAGCTATGACC

❖ pFAST-T Simple 载体多克隆位点序列:



【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。